

⑤ Int. Cl².C 12 D 13/04
C 12 K 3/00

⑥ 日本分類

36(2) D 73
36(2) B 32

⑨ 日本国特許庁

⑪ 特許出願公告

昭51-42199

特 許 公 報

④ 公告 昭和 51 年(1976) 11 月 13 日

庁内整理番号 7349-49

発明の数 2

(全 8 頁)

1

2

⑤ プランの製造方法

② 特 願 昭 4 7 - 8 7 9 3 8

② 出 願 昭 4 7 (1 9 7 2) 9 月 4 日

公 開 昭 4 9 - 4 2 8 9 4

④ 昭 4 9 (1 9 7 4) 4 月 2 2 日

⑦ 発 明 者 加藤耿相

岡山市奉還町 3 の 1 の 1 6

同 塩坂誠

岡山市洲崎 3 0 5

⑦ 出 願 人 株式会社林原生物化学研究所

岡山市下石井 1 の 2 の 3

⑦ 代 理 人 弁理士 後藤道生 外 1 名

⑤ 特許請求の範囲

1 プラン生産能を有する微生物を培養してプランを製造する工程に於て、その培養培地の PH 及び又は磷酸イオン濃度を調節することにより、生成するプランの重合度を調節し、且つ収率及び培養時間を調節することを特徴とするプランの製造方法。

2 プラン生産能を有する微生物を培養してプランを製造する工程に於て、その培養培地中にデーツ抽出液を使用し、培地の PH 及び又は磷酸イオン濃度を調節することにより、生成するプランの重合度を調節し、且つ収率及び培養時間を調節することを特徴とするプランの製造方法。

発明の詳細な説明

プランはグルコースの重合体であつて α -1,4-グルコシド結合よりなるマルトトリオースの両端に於て α -1,6-グルコシド結合により反復重合した形の多糖体であつて、シユークロース、グルコース等を炭素源として、ブルラリア・プランスに属する菌株を通気培養すれば菌体外に蓄積せられることは Biochem. Biophys. Acta 36 309 (1959) の H. Bender の報告、工業化学会誌第 67 巻 575-

760 (1964) の上田誠之助の報告、又は農芸化学会誌 43 115-118 (1969) の二宮英治の報告等に見られる通りである。しかし得られるプランの重合度に関しては数百~数千と発表され、培養条件と重合度との関係に就いては何等明示されていない。

本発明者等はプランの使用目的に応じて重合度を調節することを目的として培養条件を種々検討した結果、プラン培養培地の始発 PH を低くするか、又は含有する磷酸イオン濃度を減少することにより生成するプランの重合度を大巾に増大させることができ、又逆の場合はプランの重合度を減少させることを発見し、プランの使用目的に適合した重合度の製品を得ることに成功した。又同時に始発 PH の上昇は培養時間を短縮し、プランの対糖収率を増加させ得ることを見出し、プランの工業生産に於てその重合度の調節と共に収率、培養時間の調節を自由に行い重合度の要求に応じた最も経済性の高い製造を可能にしたもので、プランの大量生産に重要な意義を有するものである。

以上のような発見によりプランの低重合度物、即ち粘度を必要としない利用、又はプランの分解によるマルトトリオースの製造等には高 PH、高磷酸イオン濃度の培養培地による培養により 10 万以下の分子量を有し、且つ収率良く又短時間の培養によるプランの製造をも可能にし、又生成プランの精製も容易にし工業生産には大なる効果を発揮する。

又逆に高分子量的特性を利用してフィルム、シート、繊維等の成型物の製造原料とする場合は、培養培地の PH を低くし、磷酸イオン濃度を下げることにより、分子量 200 万以上のプランを得ることができ、透明強靱なフィルム、繊維等の製造が可能になる。

その他プランの食品の増粘剤、分散剤、粘着剤等として利用する時はそれぞれに適した重合度

3

のプルランの製造が可能になつた。

本発明に用いる菌株はプルラン生産能を有する菌株であれば何れの菌株でも良く、又その類似する変移菌株でも良い。例えば *Pullularia fermentans* var *fermentans* IFO 6401, *Pullularia fermentans* var *fusca* IFO 6402, *Pullularia pullulans* AHU 9553, *Pullularia pullulans* IFO 6353 又は *Dematium pullulans* IFO 4464 等多くの菌株が用いられる。10

培養培地としては前記文献にある様な炭素源シユクロース、転化糖、異性化糖、果糖、グリコース等が用いられるが、特に本発明者等の先願になる「特願 46-79413 プルランの製造法」に示した様な澱粉部分加水分解物を用いた時に効果が大きい。15 窒素源としては通常用いられるアンモニウム塩、硝酸塩又は有機窒素としてペプトン等が用いられる。他に磷酸塩、マグネシウム、鉄等の金属イオンの適量を加え液体培地を調整し、加熱滅菌した後 PH を調整して菌株を植菌し、通気培養又は振とう培養を行うことは常法通りである。培養温度は 25~30℃ で 27℃ 位が好ましい。培養時間は大体 7 日以内であり、3 日位で相当量のプルランの生成が見られ、粘度増加が起こる。残糖を経時的に測定して最低になつた時に培養を中止し、25 常法通り菌体を遠心分離により除去し、色素の生成の甚だしい時は活性炭の添加により脱色し、出来得れば濃縮してメチルアルコール、エチルアルコール等親水性の有機溶媒を加えてプルランを沈澱させて遠心分離し、必要ならば温水に溶解し、30 アルコール類の添加による沈澱精製を繰返す。製品は乾燥後収率を測定する。プルランは白色、水可溶性の粉末として得られる。

以上の培養により得られるプルランの重合度、収量は培養条件により大巾に変化する。即ち分子 35 量は 5 万~450 万、対糖収率は 20~75% の変化が見られる。

前述の様に一般的なプルランの製法を挙げたが、本発明の PH、磷酸の影響に就いて説明すれば、実施例に示す如く澱粉部分加水分解物の 10% を 40 炭素源とし、ペプトンを窒素源として他に K_2HPO_4 , $NaCl$, $FeSO_4$, $(NH_4)SO_4$ を少量含有する培地で培養した場合、培地の始発 PH を 5~7.5 の範囲に変化させた時の培養の経過を

4

数種の菌株に就いて見ると、PH 6.5 以下に於ては粘度(培養液)は増加して 300 c. p. 以上となり明らかに粘性を示し、PH 7.0 以上では粘度は低く 240 c. p. 以下で殆んど粘性が見られな。この際前記方法で分離精製したプルランは PH 5~6 では重合度(分子量)10~400 万と増加し、培養液自身も非常に粘性を増加して培養液が流動不可能になる。一方 PH 6.0 以上の場合その粘度は殆んど感じない程度で低く、生産も少なそうに思われるが収率としては 50~75% が得られた。その分子量はセファデックス 戸過で分離した結果 5~10 万位の低分子であることが知られる。

古い文献に於ては収率 20~50% であること 5 にくらべ収率の明らかな増加が認められた。

PH の種々異なる培地で 4 日、6 日、7 日の培養経過を見ると、低 PH (5.5) に於ては粘度は 1000 c. p. 以上を示すのに対し、PH 7.0~8.0 に於ては粘度 24~31 c. p. を示すに過ぎない。しかし収率を比較すると高 PH である PH 7.0~8.0 に於ては 50% 以上の高収率を示した。即ち PH 5.5 で対糖収率 30% のものが PH 6.5~7.0 に於ては対糖収率 50% 以上を示した。この場合の平均分子量は PH 6.0 で約 300 万であるが、PH 7.0 に於ては約 8 万であつた。このように収率が変わると共に平均分子量も大巾に変化させることが可能である。

又この場合の残糖の変化、対糖収率を 4 日、6 日、8 日に就いて見ると残糖は最終まで徐々に減少し、収率は増加する。尚 8 日目の残糖は、3g/100 ml 以上である。しかし PH 7.0~7.5 に於ては残糖は 3~4 日で大部分 減少し 0.1~1.0 g/100 ml でありプルラン収率はこれに並行して 4~6 日で殆んど最高値に達する。即ち PH の高い方が糖消費とプルランの生成が早く又収率も高いことを示している。

前述した様な PH の調整によるプルラン収率の増加、培養時間の短縮効果は、デーツ抽出液を炭素源として使用した時に特に顕著に現われる。

デーツ抽出液はデーツの約 50% の糖質を含有し、その組成はグルコース、フラクトースを大体等量含有し、他は無機塩類を含有し、Total anion は 2500~3500 mg as $CaCO_3/l$ である。本液を活性炭脱色又はそのまゝ培地の

5

炭素源として用いる時は、培養時間は同様に短縮され収率も増加する。しかしデーツ抽出液をイオン交換精製して純糖液として用いる時は、澱粉部分分解物又は蔗糖を炭素源とした場合と同様で、特別の変化は見られない。このことはおそらく多量に含まれるイオンの緩衝作用により、培養末期までPHの低下が起こらないことに原因すると考えられ、工業的実施に当りデーツ抽出液を炭素源として使用することは優れた特徴があるものと考えられる。

更に培養培地の磷酸濃度が培養時間と収率に影響する。例えば K_2HPO_4 を0.1~0.5%の濃度で使用し、PH 5.5~6.5で試験した結果は、PH 5.5に於ては前記の通り高分子量のプルランが得られ、150~450万の分子量を示すが、15 磷酸濃度に並行して分子量は減少し、0.1~0.3%の磷酸濃度では200~300万の分子量のプルランが得られ、PH 6.5に於ても同様に磷酸濃度0.5%ではプルラン分子量は7万であるが0.1~0.2%では約20万の分子量を示す。以上の様20に始発PHの低い時は一般に分子量は大であるが、磷酸濃度により変動する。か様に始発PH及び磷酸濃度の変化に伴い生成プルランの分子量を制御

6

することができる。

実施例 1

PH変化による生成プルラン分子量の変化

a) 使用菌株は *Dematium pullulans*

IFO 4464, 及び *Pullularia pullulans*-2 (Kp-13 と呼ぶ) である。

培養培地は水飴 (DE43) 10%, K_2HPO_4 0.2%, NaCl 0.2%, ペプトン 0.2%,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, よりなる培地を用い、種培養は上

記培地に各菌株を27℃で2日間培養したものを2~3%用いた。

本培養は上記培地100mlを500ml三角フラスコに採り、滅菌後PHを5.5~7.5に調整し、各菌株の種培養液を2%添加して回転振とう機で27℃で7日間培養した。

培養終了後菌体を遠心分離し、上澄液に粉末活性炭を加えて脱色ろ過し、メチルアルコールを加えて50%濃度にし、沈澱を遠心分離し、少量の水に再溶解し、メタノール沈澱を繰返し精製後メタノールで洗浄して真空乾燥した。

実験結果は下表の通りである。

第 1 表 Dematium pullulans IFO 4464

始 発 P H	最 終 P H		※ 濁 度($\times 10$)		残 糖(g/100ml)		プ ラ ン 収 率%		平 均 分 子 量
	4 日	6 日	7 日	4 日	6 日	7 日	4 日	6 日	7 日
5.5	3.30	3.30	3.22	0.9	1.4	1.8	50.5	24.4	16.5
	3.30	3.38	3.32	0.9	1.3	1.6	51.9	23.9	17.3
6.0	3.5	3.5	3.5	0.9	1.4	1.9	3.8	2.5	2.0
	3.4	3.5	3.4	1.0	1.5	1.8	4.1	2.8	2.2
6.5	3.7	3.6	3.6	1.1	1.5	1.7	2.8	1.7	1.7
	3.7	3.6	3.7	1.0	1.7	1.7	2.9	1.9	1.8
7.0	3.9	3.9	3.8	1.1	1.8	2.0	1.9	1.5	1.0
	3.9	3.9	3.8	1.1	1.7	1.9	2.0	1.3	1.2
7.5	4.2	4.2	4.2	1.1	1.9	2.0	1.8	1.0	0.5
	4.2	4.2	4.3	1.2	1.8	2.0	1.9	1.1	1.0
8.0	4.7	4.5	4.6	1.2	1.8	2.0	1.5	0.1	0.08
	4.7	4.5	4.7	1.1	1.7	2.0	1.6	0.3	0.05

K P - 1 3

始 発 P H	最 終 P H	※ 濁 度 (×10)	残 糖 (g/100ml)	プルラン収率%	平均分子量
	4日 6日 8日	4日 6日 8日	4日 6日 8日	4日 6日 8日	
5.5	3.3 3.3 3.2	0.9 1.3 1.8	5.0 1.9 1.2	17 27 38	246×10 ⁴
6.0	3.4 3.4 3.3	1.1 1.5 1.8	2.8 1.7 1.0	31 40 55	292 "
6.5	3.6 3.6 3.5	1.2 2< 2<	1.6 1.0 0.1	35 68 70	20 "
7.0	4.0 3.9 3.9	1.3 2< 2<	1.5 0.5 0.05	31 69 75	8 "

※ 濁度(×10)は10倍稀釈液の濁度を示す。

以上の結果はKP-13と *Dematium pu-15* *PH 6.5以上に於て培養時間も半減し、又収率も *Ilulans*に就ての結果は必ずしも一致しないが、向上することが確認される。
 PHに就いては7.0以上では分子量は非常に小となり、6.0以下では非常に大になりその変化の傾向は一致する。分子量の絶対値は各菌株により多少の差は現われる。又収率と培養時間の傾向は *20

b) 実施例1-a) に準じKP-13菌株を用い培養培地として炭素源にシユークロースを用いて培養した結果は次の表の通りである。

第 2 表

K ₂ HPO ₄ 添 加 %	始 発 P H	対 糖 収 率 %		平 均 分 子 量
		4 日	7 日	
0.1	5.5	21	27	250×10 ⁴
0.2		35	40	250 "
0.3		35	42	280 "
0.4		36	43	260 "
0.5		37	46	150 "
0.1	6.0	20	25	280×10 ⁴
0.2		37	50	300 "
0.3		37	55	200 "
0.4		40	61	80 "
0.5		41	67	30 "
0.1	6.5	20	26	20×10 ⁴
0.2		31	39	15 "
0.3		57	65	8 "
0.4		68	70	7 "
0.5		70	72	7 "

11

12

c) 実施例1-a) に準じ、*Pullularia pullulans* IFO 6353 菌株を用い、グルコースを炭素源として培養した結果は次の表の通りである。

第 3 表

K ₂ HPO ₄ 添 加 %	始 発 P H	対 糖 収 率 %		平 均 分 子 量
		4 日	7 日	
0.1	5.5	18	25	270 × 10 ⁴
0.2		21	32	270 "
0.3		31	38	280 "
0.4		34	40	200 "
0.5		35	40	110 "
0.1	6.0	20	28	180 × 10 ⁴
0.2		38	49	200 "
0.3		41	57	200 "
0.4		43	63	50 "
0.5		45	65	20 "
0.1	6.5	25	28	25 × 10 ⁴
0.2		34	37	15 "
0.3		61	68	8 "
0.4		65	68	5 "
0.5		67	70	5 "

以上の通りグルコース培地に於ける培養に於ても磷酸イオン濃度、始発PHのプルラン収率及びプルラン分子量に及ぼす影響は同一傾向を取ることがわかれる。

実施例 2

PH と K₂HPO₄ 濃度変化に伴うプルラン分子

量の変化

使用菌株及び培養条件は実施例1-a) に等しい。PH変化は5.5～6.5, K₂HPO₄ %は0.130～0.5%に変化した場合の平均分子量の変化を次表に示す。培養日数は7日である。

使 用 菌 株 KP-13

K ₂ HPO ₄ 添 加 %	始 発 P H	対 糖 収 率 %	平 均 分 子 量
0.1	5.5	25	200 × 10 ⁴
0.2		38	250 "
0.3		38	300 "
0.4		40	260 "
0.5		47	150 "
0.1		23	200 × 10 ⁴

13

14

0.2	6.0	55	300×10^4
0.3		59	150 "
0.4		65	70 "
0.5		70	20 "
0.1	6.5	25	20×10^4
0.2		40	20 "
0.3		70	6.5 "
0.4		72	7.0 "
0.5		73	7.0 "

使用菌株 IFO 4464

培地 PH 6.5

K_2HPO_4 添加 %	対糖収率 %	平均分子量
0.1	40	200×10^4
0.2	60	200 "
0.3	70	290 "
0.4	70	350 "
0.5	71	62 "

以上の結果より見る時 0.2～2.4%の K_2HPO_4 25 2500～3500mgである。本液を更にイオン交換精製した液を製し、両糖液を炭素源とした。対糖灰分として2%前後あり、活性炭脱色液を炭

実施例 3

本実施例は菌株培養の炭素源としてデーツの抽出液を用い他の条件は実施例1にならつた。デーツは食用及び工業デーツを3～4倍の温水に浸漬し、時々攪拌し3時間後上澄液を集めて粉末炭にて脱色して精製した。濃度18%（還元糖として）その50%はグルコース、残りは果糖と少量のペントース等を含有する。（着色度は大で）トータルアニオンは $CaCO_3$ として1ℓ当り

素源として実施例1同様10%用いた。

デーツ抽出液10%（固型分として）、 K_2HPO_4 30 0.3%、ペプトン0.2%、 $NaCl$ 0.2%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%、を含む培地を滅菌し、これをPH 6.5に調整し、種菌は41時間培養液を2%添加し、144時間振とう培養した。後処理は実施例1の通りブルラ 35 ンを分離し収率、分子量を測定した。

15

16

糖(デ-ツ) 種 類	終 末 PH				濁 度 ($\times 10$)				残 糖 (g/100ml)				対 糖 収 率 %			
	hr 48	hr 96	hr 120	hr 144	hr 48	hr 96	hr 120	hr 144	hr 48	hr 96	hr 120	hr 144	hr 48	hr 96	hr 120	hr 144
デ-ツ	4.6	4.6	5.5	1	0.95	1.25	1.22		4.7	0.4	0.5		22.9	68	67	
脱色液	4.7	5.0	5.6		0.96	1.23	1.25		4.3	0.2	0.3		30.6	73	76	
デ-ツ	3.8	3.8	3.8	3.9	0.7	0.9	1.0	1.0	5.5	2.4	1.0	0.2	19	45	51	58
イオン交換 精 製	3.8	3.7	3.7	3.7	0.6	0.8	0.9	1.0	6.2	3.1	2.1	1.1	23	46	59	60

以上の結果の明示する通りデ-ツ抽出液は培地炭素源として良い結果が得られるが、イオン交換精製と非精製との間に培養経過及びプルラン生成 15

時期に明らかな差が見られ、イオン精製しない液の方が培養時間は少なく好収率が得られた。

Translation of page 1, left column, lines 15 to 27

"CLAIMS:

1. In a process for producing pullulan by culturing a microorganism capable of producing pullulan, the improvement wherein the pH and/or the concentration of phosphoric-acid ion of the culture is controlled to regulate the polymerization degree and the yield of the produced pullulan, as well as the culturing time.

2. In a process for producing pullulan by culturing a microorganism capable of producing pullulan, the improvement wherein a date extract is used in a culture medium and the pH and/or the concentration of phosphoric-acid ion of the culture is controlled to regulate the polymerization degree and the yield of the produced pullulan, as well as the culturing time."

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.